Feel so Bio 19キットシリーズ

#009 DNA電気泳動 キット

取扱説明書

ver.1.2

nest® リバネス
身近なふしぎを興味に変える
Leave a nest

コスモ・バイオ株式会社

目次

本キットの特徴 ･･･ 2

使用時に必要な試薬･機材等の一覧 ･･･ 3

内容物について ･･･ 4

分注について ･･･ 5

アガロースゲル電気泳動の原理 ･･･ 6-8

実験手順 ･･･ 9-10

DNA染色の方法 ･･･ 11

付録1　DNA染色の方法 ･･･ 12

付録2　アガロースゲルの濃度 ･･･ 13

付録3　予想されるDNA断片の電気泳動像 ･･･ 14

本キットの特徴

本キットは、アガロースゲル電気泳動法によるDNAサンプルの検出と分析を体験するキットです。

本キットでは、大腸菌のラムダ・ファージのDNAを制限酵素によって処理することで得られたDNA断片を分離します。本キットの実験を通し、DNAの化学的・電気的性質やアガロースゲル電気泳動法の原理を詳しく学ぶことができます。

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容 【生徒20名（2人一組）分】

・DNAサンプル1	(60μL)	1本
・DNAサンプル2	(60μL)	1本
・ローディングバッファー	(60μL)	1本
・アガロース	(3g)	1袋
・40倍濃縮泳動バッファー	(50mL)	1本
・マイクロチューブ	(50本)	1袋
・取扱説明書（本書）	1冊	

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・マイクロピペット	20μL用	5本（各班1本）
	200μL用	1本（分注用）
・マイクロピペット用チップ		6箱（各班1個及び予備）
・電気泳動槽		2～5個
ミニゲルを2個泳動できる個数をご用意下さい。		
・DNA染色液		適量
株式会社アドバンス社のMupid Blueを推奨しています。		
（Mupid Blueを用いた染色法はp11に記載しました。）		
・染色用タッパー		5個（各班1個）
・脱色用タッパー		5個（各班1個）
・精製水		適量

※キットに含まれる電気泳動関係の試薬の量は、株式会社アドバンス社の 電気泳動槽、Mupid Sの使用を想定しております。

※機材につきましては弊社で取り扱っております。ご入用の際にはお問合せ下さい。

内容物について

DNAサンプル１

制限酵素*Hind* IIIで切断したラムダファージDNAです。10μgのDNAが70μLのTEバッファーに溶けています。-20℃にて保存してください。

DNAサンプル２

制限酵素*Eco* RIで切断したラムダファージDNAです。 10μgのDNAが70μLのTEバッファーに溶けています。-20℃にて保存してください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNAサンプルをアガロースゲルにアプライする際に使用します。常温にて保存してください。色素を含むため、手や衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。

40倍濃縮泳動バッファー

40倍の濃度に濃縮したTAE（トリス-酢酸-EDTA）バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNAサンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4℃にて保管してください。電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水で40倍に希釈してご使用ください。

分注について

班構成

本実験キットでは4人1班（実験は2人一組）を推奨しています。

機材一班分

DNAサンプル1	…10uL
DNAサンプル2	…10uL
ローディングバッファー	…10uL
40倍濃縮電気泳動バッファー	…100mL（40倍希釈後）
アガロース	…1個

※使用する電気泳動層により必要量が変わります。本実験では、株式会社アドバンスの電気泳動層、Mupid Sの使用を想定しております。

※内容物のご説明と取扱いの項、及び実験手順の項に従って試薬を溶解してください。

アガロースゲル電気泳動の原理

アガロース電気泳動法とは

アガロース電気泳動法は、DNAやRNAなどの核酸をそれらの電気的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「－」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース（※）のゲルの網目構造内を＋極側に移動します。長いDNA断片は網目構造内をゆっくりと（引っかかりながら）動くのに対して、短いDNA断片はより速く（あまり引っかからずに）動くことから、アガロースゲル電気泳動法では、DNA断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究においてDNA断片の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える最も基本的な技術です。

※アガロースとは？

アガロースとは、「寒天」の主要な成分のことです。二種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特にDNAの分子量を分析する際によく利用されます。

DNAの電気的性質

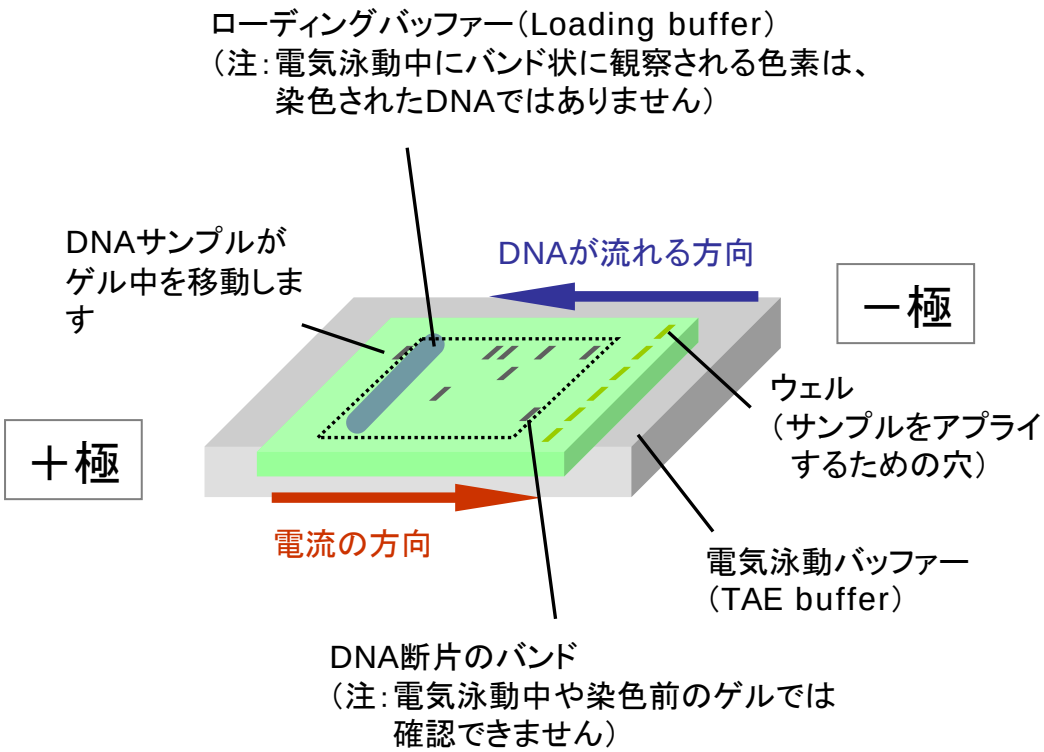
DNAは、リン酸基・塩基・デオキシリボース（糖の一種）によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNAの場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがってDNAはヌクレオチド数、すなわち分子量（※）に比例した電荷を持っていることになります。これはDNAの電気的な性質で最も重要な点です。

※DNAはヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します（塩基の種類によって多少の誤差が生じます）。一般的にDNAの大きさは分子量で表わさずヌクレオチドの長さ（塩基対数、base pair：bp）で表わします。

アガロースゲル電気泳動法では、このようなDNAの電気的な性質を利用します。アガロースによるゲルマトリックス（アガロースゲル）内に電圧をかけることで電場を生じさせ、DNA断片を長さ（単位は塩基対を意味するbp：base pair）によって分離します。DNAは二重らせんとよばれる単一な構造をとっているため、DNAは分子量による移動度の差によって分離することができます。

下の図は、アガロースゲル電気泳動の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつDNAの分解が起こりにくいTAEバッファーで満たし、TAEバッファー中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルを注入（アプライ）するための穴があり、ここにDNAサンプルをマイクロピペットを用いてアプライします。DNAサンプルのアプライ後のゲルに電圧をかけ電流を流すことでDNA断片をサイズによって分離することができます。



DNAサンプルを電気泳動する際には、あらかじめDNAサンプルをローディングバッファーと混和します。これによりDNAサンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルにDNAサンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめDNA断片のサイズの分かっているDNAサンプルを「DNAのモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA断片を可視化するために染色します。DNA染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド（EtBr）、Mupid Blueなどが挙げられます。EtBrは検出感度に優れていますが、DNAの二重鎖の間に入り込む（インターカレーションする）物質であり、発がん性が認められます。また、DNA断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全なMupid Blueを使用の使用を推奨します。

電気泳動の準備と手順

実験の手順（実験前に準備していただくこと）

①　電気泳動バッファーの作成

40倍濃縮泳動バッファーを975mLの精製水で40倍に希釈します。キットで使用を推奨している電気泳動層、Mupid-Sでは電気泳動バッファーを約100mL/台　使用します。

②　アガロースゲルの作成

１）300mLの三角フラスコに1.4gのアガロースを入れ ①で作成した1xTAEバッファー200mLを加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで軽く閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は突沸した水蒸気が手にかかるなどやけどの危険性がありますので、必ず軍手の上にビニール手袋をして作業を行ってください（**この作業はやけどの危険があります。必ず指導者が行うようにしてください**）。

２）溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。②で融解したアガロースを、ある程度（50℃程度）まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作成するためのコームを差し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。

※200mLのアガロース溶液で、小さいゲルが約8枚、大きなゲルでは4枚作成できます。ゲルメーカーが一個しかない場合で、小さいゲルを4枚以上作成したいときには、１）のステップで、0.7gのアガロースを100mlの泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作成を行なってください。また、一度固まってしまったゲルでも、再度レンジで温めることで溶解し、ゲルを作成することが可能です。

作成したアガロースゲルは、希釈後の泳動バッファーに浸した状態で一ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

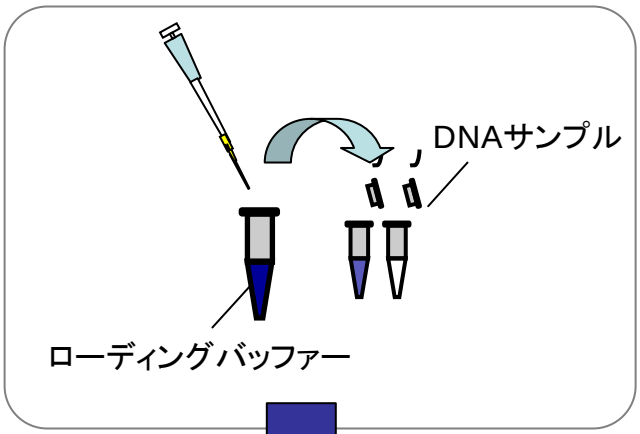
実験の手順

① 電気泳動槽の準備

電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェルが来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルのウェルが必ず電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください（参考：Mupid-Sでは約100mL程度）。

② DNAサンプルの調整

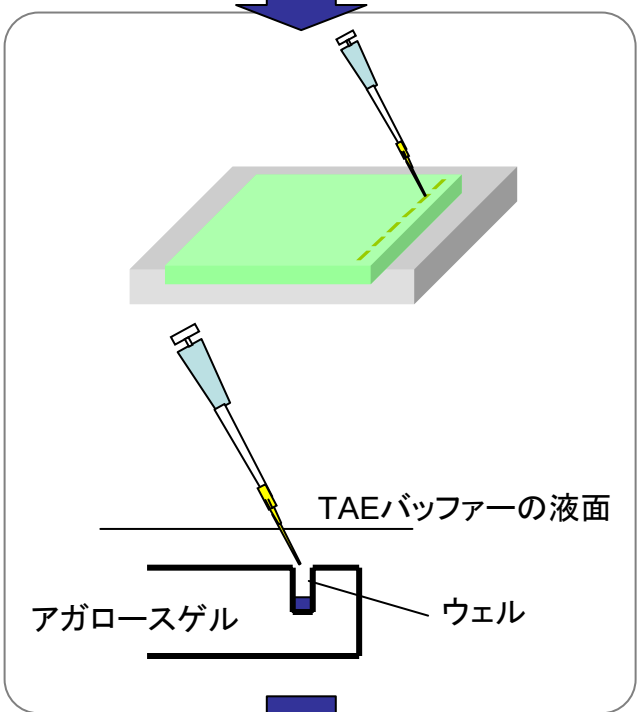
本キット添付のローディングバッファーを5μLずつPCRの終了したPCRチューブに加えよく混ぜます（合計35μL）。DNAマーカーには2μLのローディングバッファーを加えてよく混ぜてください。



③ DNAサンプルのアプライ

PCRサンプルを別々のウェルにアプライします。

アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

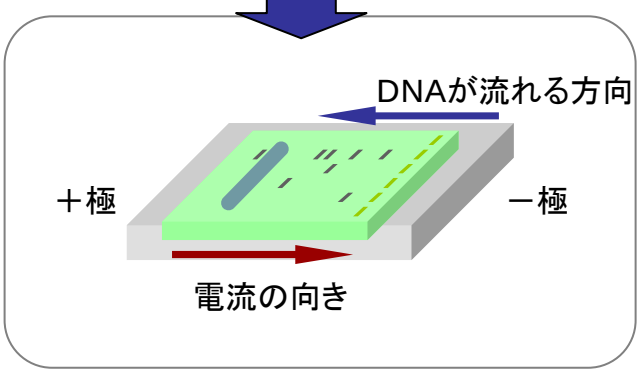


④ アガロース電気泳動

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNAはマイナスの荷電を持っていますので、プラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください（参考：Mupid-Sでの電気泳動条件は100ボルトで20分程度となります）

⑤ アガロースゲルの染色

次ページ「DNA染色の方法」をご覧ください。



DNA染色の推奨方法

＜Mupid Blueを使用したDNA染色法＞

Mupid Blue

50倍に濃縮されたDNAの染色液です。電気的性質によってDNAと結合することで青色を呈するため、電気泳動の結果を確認することが可能です。インターカレーション型と呼ばれる染色液と異なり、発がん性がなく安全な試薬です。常温にて保存し、使用の際は精製水にて50倍に希釈してご使用ください。

DNA染色液による染色では脱色の操作が必要となります。脱色の操作では精製水を用います。

※ DNA染色液は無害ですが色素を含んでおり、衣服・皮膚などに付くと汚れますので取扱いの際にはビニール手袋・白衣等を着用することをお勧めします。

① DNA染色液を精製水で50倍希釈し、タッパーに入れる。脱色用の水をタッパーに用意しておく。

② 電気泳動の終わったアガロースゲルをDNA染色液のタッパーに入れ、2分間ゆっくりと手で振盪する（2分以上染色を続けると脱色がきれいにできなくなりますので、時間を厳守してください）。

⑤ 精製水にアガロースゲルを移し、DNA断片のバンドが確認できるまで精製水を交換しながらゆっくりと手で振盪する。

⑥ 観察（デジタルカメラ等でアガロースゲルを撮影することが可能です。

付録1　DNA染色の方法

エチジウムブロマイド（EtBr）を使用する場合

エチジウムブロマイド（EtBr）は、感度良くDNAを検出できるため、バイオテクノロジーの研究では最も一般的に使用される染色液です。

＊＊＊注意！！！＊＊＊

EtBrは、発がん性物質です。皮膚に直接触れないようにビニール手袋をするなど十分に注意してください。使用の終わったEtBrは流しなどには流さず、自治体の指定の処理方法に従って廃棄してください。また、紫外線照射装置を使用する際は肉眼では絶対に直視せず、防護メガネなどを使用しましょう。

① EtBrを0.5μg/mLになるようにEtBr溶液を調製し、タッパーに入れる。
② 電気泳動後のアガロースゲルをEtBr溶液に10～30分浸す。
③ 紫外線照射装置に②のアガロースゲルを置き、紫外線を照射する。
④ 観察（ポラロイドカメラなどで撮影を行うことが可能です）。

付録2　電気泳動法

泳動バッファー

DNAの電気泳動では、一般にTAE bufferやTBE bufferが用いられます。TAE bufferは数kb以上の比較的長いDNA断片の分離に適しているのに対して、TBE bufferはそれよりも短いDNAの分離に適しています。

アガロースゲルの濃度

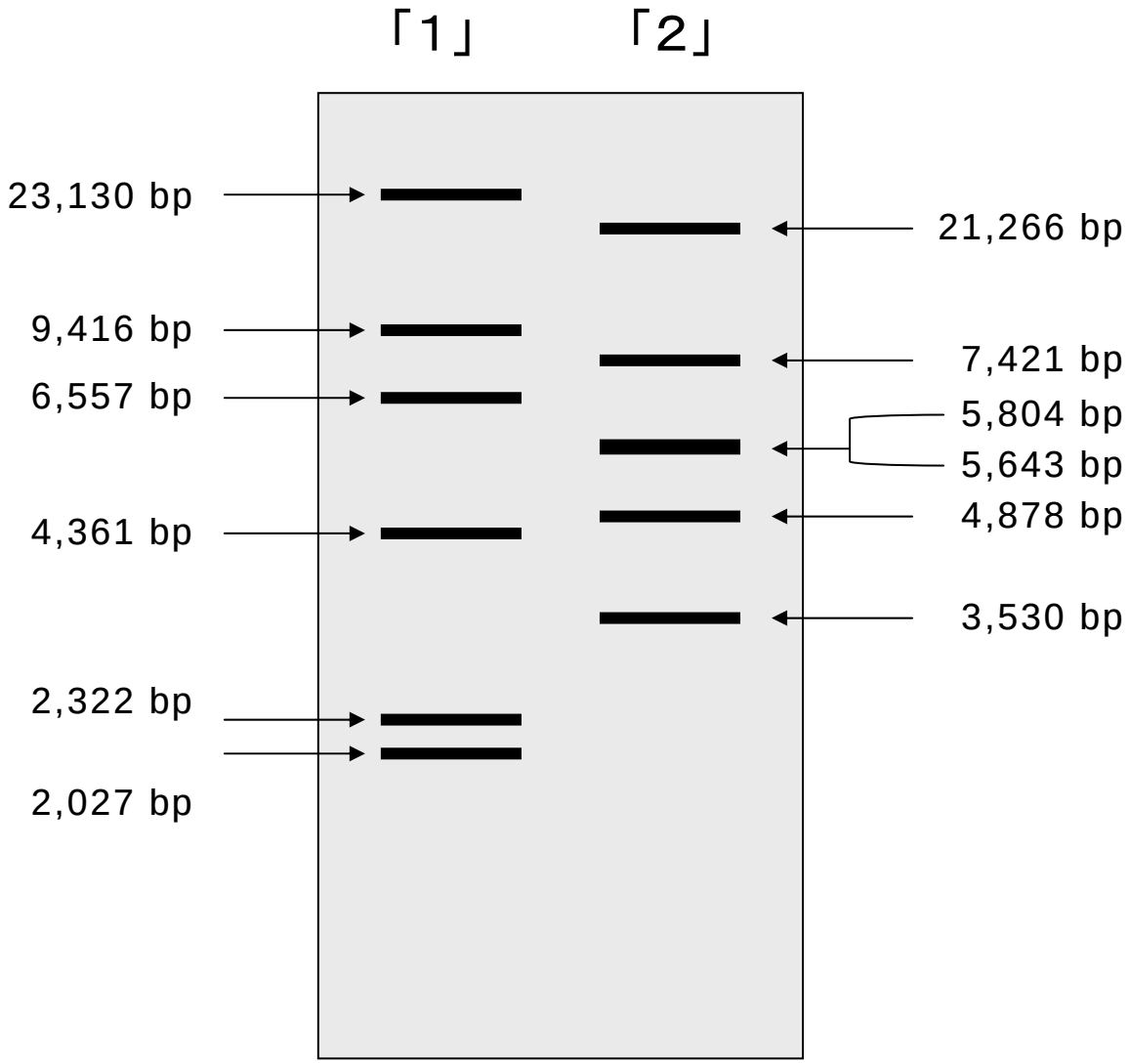
電気泳動法によるDNAの分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が上がれば上がるほどゲルマトリックス分子とDNA断片の相互作用は強くなりDNA断片の移動度が小さくなるため、より細かいDNA断片の分離が可能となります。分離したいDNA断片の長さによって適当なアガロース濃度を選択することが大切です。本キットでは、0.7%のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

アガロース濃度 (%)	分離できるDNA断片の長さ (bp)
0.6	1,000~20,000
0.7	800~10,000
1	500~7,000
1.2	400~6,000
1.5	200~3,000
2	100~2,000

付録3
予想されるDNA断片の電気泳動像

予想されるバンド像

本キットに含まれるDNAサンプル1およびDNAサンプル2の0.7%アガロースゲルにおける電気泳動のバンド像は下図のようになります。各バンドの横にDNA断片の長さ(bp)を示します。



ご使用上の注意

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載されたプロトコル以外での使用につきましては、保証の限りではございません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

カスタマーサポート

Feel so Bioシリーズ　カスタマーサポート係
FAX:03－3656－2870
Mail:info@feelsobio.net

※FAXをご利用の場合は、同封のFAX用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

株式会社リバネス
〒124-0024
東京都葛飾区新小岩3-25-1-208
TEL/FAX 03-3656-2870
URL:http://www.leaveanest.com/

販売

コスモ・バイオ株式会社
〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
TEL：(03) 5632-9610　FAX：(03) 5632-9619
e-mail：mail@cosmobio.co.jp
URL：http://www.cosmobio.co.jp/

Leave a nest